

- 454.
- [34] Danny N. P. Doan, Heidi Rudi, Odd-Arne Olsen. 1999, *Plant Physiology*; **121**:965 - 975.
- [35] Plaxton W. C. and Preiss J. 1987, *Plant Physiol.* **83**:105 - 112.
- [36] Preiss J. 1991, In *Oxford Surveys of plant molecular and cell biology*. Vol. 7, B. J. Mifflin ed. (Oxford: Oxford University Press). pp. 59 - 114.
- [37] Okita T. W. 1992, *Plant Physiol.* **100**:560 - 564.
- [38] Preiss J., Ball K., Smith-White B., Inglesias A., Kakefuda G. and Li L. 1991, *Biochem. Soc. Trans.* **19**:539 - 547.
- [39] Hylton C. and Smith A. M. 1992, *Plant Physiol.* **99**:1626 - 1634.
- [40] Stark D. M., Tmmerman K. P., Barry G. L., Preiss J. and Kishore G. M. 1992, *Science*. **258**:287 - 292.
- [41] Preiss J. and Romero T. 1989, *Adv. Microbiol. Phys.* **30**:183 - 238.
- [42] Kooistra E. 1962, *Euphytica*. **11**:357 - 373.

研究工作

银杏雌雄基因组 DNA 间的差异性分析

王晓梅* 宋文芹 李秀兰 陈瑞阳
(南开大学生物系 天津 300071)

在高等的显花植物中绝大多数为两性花 (hermaphrodite) 物种, 仅有极少数的物种为严格的雌雄单性异株 (dioecious) 或雌雄单性同株 (monoecious) 植物^[1]。在这些雌雄单性异株植物中又仅有少数的物种具有异型性染色体^[2], 并且异型性染色体控制了植物的性别表型。在被子植物中如白麦瓶草 (*Silene latifolia*) 和酸模 (*Rumex acetosa*) 的性别及其决定机制在细胞和分子水平都得到了广泛和较为深入的研究。由于植物雌雄个体的营养器官具有一致的表型, 它们的性别差异主要表现在花器官上, 而裸子植物通常要经历许多年才能开花, 分辨雌雄, 得到性别确定的个体, 所以在雌雄异体的裸子植物中, 其性别的细胞学特别是分子生物学方面少有研究。虽然几十年前就开始在细胞水平研究了银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 的性染色体^[3-7], 但关于其染色体的性别决定类型至今仍是一个悬而未决的问题。同时由于银杏的性别不同应用价值不同, 且银杏需要二十多年才能开花分辨雌雄, 因此人们一直关注银杏的早期性别鉴定, 因而有必要从分子水平探讨银杏两性基因组间的差异性, 它不仅具有潜在的应用价值, 而且对探讨其性别分化也具有一定的理论意义。

自从 1990 年 Williams 和 Welsh 创立 RAPD 技术以来, 已广泛用于基因组研究的各个方面。该技术是迄今研究遗传变异、多态性等最简单最快速的方法, 这是 RFLP 和 AFLP 技术难以达到的, 因此利用 RAPD 技术检测雌雄异株银杏基因组间的多态性, 寻找性别差异有其特有的优势。该技术已成功的用于啤酒花 (*Humulus lupulus*)^[8] 和白麦瓶草 (*Silene latifolia*)^[9] 的研究中。本研究利用 RAPD

技术, 检测了雌雄银杏基因组间的多态性, 这一分子水平的研究将有助于寻找与银杏性别相关的分子标记或性别特异性的探针, 最终有望为银杏性别的鉴定提供理论依据。

材料与方 法

1. 植物材料

取自辽宁省兴城市中国农科院果树研究所。已知性别的成年银杏雌雄各 10 株, 将其幼叶液氮速冻后, -70℃ 保存。

2. DNA 的提取

取 0.2g 银杏幼叶于液氮中研成粉末, 加 2ml DNA 提取缓冲液 (1% CTAB, 5% PVP, 1.4mol/L NaCl, 80mmol/L Tris-HCl pH8.0, 20mmol/L EDTA pH8.0), 56℃ 保温 30min, 酚、氯仿抽提, 异丙醇沉淀, TE (10mmol/L Tris-HCl pH8.0, 1mmol/L EDTA pH8.0) 溶解后, RNase (终浓度 200mg/L) 37℃ 处理 2 小时, 酚、氯仿抽提, 乙醇沉淀, TE 溶解, 4℃ 保存备用。

3. 雌雄基因组 DNA 间多态性检测及与性别相关的 RAPD 标记的筛选

取等量的个体基因组 DNA 组成雌雄两个 DNA 池, 首先用于 RAPD 引物的筛选, 检测雌雄基因组 DNA 间的多态性, 之后对有差异的引物再随机选取雌雄各五株做个体分析。

RAPD 反应采用热启动 PCR。反应体系为 25μl, 其中含有 10mmol/L Tris-HCl, pH8.3, 50mmol/L KCl, 2.5mmol/L MgCl₂, 0.5μmol/L 引物 (购自上海生物工程公司及香港大学动物学系孙梅博士惠赠) 和 250μmol/L dNTP (上海生物工程公司), 10-40ng 基因组 DNA, 1.5U Taq DNA 聚合酶 (北京高登沃德生物制品有限公司)。每个反应为 40 个循环, 前 8

本文 2000 年 11 月 27 日收到, 2001 年 6 月 11 日接受。

* 天津农学院定向培养博士研究生。

个循环 94℃ 1min, 36℃ 1min, 72℃ 2min, 后 32 个循环 94℃ 30s, 36℃ 1min, 72℃ 2min; 首次循环前 97℃ 变性 6min, 最后循环后 72℃ 延伸 8min。PCR 产物用 1.8% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 溴化乙锭染色, 紫外下拍照。

4. 差异带的回收、再扩增、克隆

将差异片段在紫外长波(365nm)下挖出, 转至 0.5mL 离心管中, 加等体积的 TE 溶液, 液氮冻溶数次, 12000rpm 离心 10min, 以上清液作模板, 用原引物进行 PCR 再扩增, 扩增体系与 RAPD 反应相同。PCR 的循环参数除退火温度提高至 50℃ 外, 其余同 RAPD 反应。PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增的片段与回收的差异片段分子量大小一致的回扩产物经纯化及 Klenow 酶补平后, 与 Sma I 酶切的 pUC19 载体平端连接, 转化至大肠杆菌 DH5 α , 在含有 X-gal、IPTG 和氨苄青霉素的 LB 培养基中 37℃ 培养过夜, 选取白色菌落, 再用 pUC19 多克隆位点两端的特异性引物对白色菌落进行 PCR 筛选^[10], 将阳性克隆用含甘油的 LB 培养基 -20℃ 保存。

5. Southern 杂交

雌雄银杏基因组 DNA 用 HaeIII 酶切后, 经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 转至尼龙膜上备用(按杜邦公司产品说明书中提供的碱转移法进行)。将鉴定保存的阳性克隆用 pUC19 多克隆位点两端的特异性引物进行 PCR 扩增, 其扩增产物经纯化后做为探针, 探针用 α -P³² 随机引物标记法标记。探针的标记按 TBD 生物技术发展中心提供的同位素标记试剂盒说明书进行, 杂交及放射自显影参照《分子克隆》^[11]提供的方法略做修改。

6. 序列测定

1000bp 左右来自雄性基因组的特异片段的序列测定由北京赛百盛生物工程公司完成。

结果与讨论

在银杏的性别研究中, 以染色体的研究居多。银杏具有 24 条染色体, 并且研究认为其中一对为性染色体, 但关于性染色体的研究不同的学者得出了两种截然相反的性染色体类型: ZW^[6] 型和 XY 型^[3-5]。因此, 关于银杏染色体的性别决定类型目前仍不能定论; 同时有些学者认为, 银杏的性染色体, 在光学水平从形态和结构上是不能区分的, 需从分子水平开展研究^[7]。

本研究将雌雄银杏各 10 株的基因组 DNA 等量混合起来, 组成雌雄两个 DNA 池, 用于银杏两性基因组间的 RAPD 分析, 这样有利于消除假阳性^[12]; 同时, PCR 反应采用热启动方法, 有利于提高 PCR 反应的特异性^[13]。研究中应用 300 个 10bp 的随机单引物及 200 对双引物组合, 首先对雌雄两个 DNA 池进行 RAPD 分析。在雌雄两个 DNA 池的 RAPD 扩增中, 每个引物及引物组合平均提供 6.9

个标记, 全部引物在各基因池中分别共得到约 3450 条带纹, 相当于检测了约 3450 个位点, 但只有一个单引物的一个位点表现出性别差异。对有差异的引物进一步做个体分析, 该引物在雄性 DNA 池及随机的雄性 5 株个体中均得到一条 1000bp 左右的雄性基因组特有的 RAPD 标记(图 1 箭头所示), 重复多次能稳定出现。该引物为上海生物工程公司 S2[#], 其序列为 TGATCCCTGG。

将本研究得出的 RAPD 数据进行统计分析得出: 雌雄基因组间的相似性为 99.98% (相似性依文献^[14]的统计方法计算得出), 此值说明银杏雌雄基因组间具有极高的相似性。这一结果同样表明, 雌雄异体的银杏与其他两性生物一样, 虽然性器官及生理行为等方面存在差异, 然而它们遗传信息的绝大部分是一致的。性别发育是一个有关分化的基因调控事件, 是对两套可轮换的遗传程序之一的精确决定与执行^[15]。

将 1000bp 左右的来自雄性特异的 RAPD 片段测序后结果如下:

M13F (用 M13 正向引物测序结果):

```
ATTNNTCTCGGTACCATGATCCCTGGCCACTACAAGCAACTCACATTTCTAAAAATTTTAAATTCA
AGGTTGTTGACGTTGAATTTCTGCGCCGATGTCGGGGGGGGGGGGGTCATTTTCGGTGTAAACAA
TTGCATTGAAAGTTTACACATAGAAGCAAAATTTAGACATGCCACTCTCCTGACACTAATTCGGTTGC
CTTTCATTTGGTACATGCATCCCAAGATTTATCAGGAATAGGGTCAAGATTTTAGGCAAGGTTAAGGG
GATATCCAATTTCCCAAGGATTCGTCATTTAGTATTGGAGGAGTTATAAGAGAGGAAAGCAAAAGGT
AAACAAAAATGATGGTGAAGGAGTGAGTCTATATGAGTTGATGGGCTCAAAAAGTAGGAGGTGATGTC
TCTCTTCAATTTTAAACATGATGTCATCGTTCCTTTACAGGGCTAGCACATGATCCTATGGATATTG
GCTCATTGANGGGCTTAAGANCAAGGGGATACATGGGAGAGTTTCCACCTATGGGGATNTCCCT
ACCTAGCACTTTCTATTACATACACTTTATTANCTATANGGNTAANGACCNCCTGGTAATTNAN
NANCTATNGGTTNATATATCCCCCANGGATTCNTNN
```

M13R (用 M13 反向引物测序结果):

```
ATGATCCCTGGCCGAGAAATACATGGTCTGAGTGTGTCACAGAAATACACTGAGTGTGTTGAGCACAAT
CCTCTGCACATTGCAGAAATACGTGCTACGATGCACGGTCAACTGGCTCTCCTCTAAAAGCCAAAAA
TTGCCTAGAAACTTGTGCTGCTGCATGGATGCTGATGCACGCTCAACACTATCCCTGTC
AAGAAAGTGGAAATATTCCTAGAGCTAATAAAGGATCTAAGAGATCTAGGATGCTCACTATCAAGAT
CTCTCTACTAATCACACAAATCATTCATCAATCTTGCCCAATAAGCCCTTGGATAAAATACAAGCTCT
CCTTTGATTCCTCTCCCTCAAGAAAAATCACAAGTTCGAAAAGTAAAAACTTCCCGTAGGATTTG
CCCTAAGCCTATTNATATGATAAGAGGCTAGGGTTTACAATANGTATCCCTNAAACCTAATTAGCTTA
TTATTAGTCAANGGAANTAATTAATGAGCAAGGACTTTACAATGGTCTNGNTTAAANCAAAATNA
ACCAACCTATGTCATGGTATTAAATGGACTNCANGNGGNGATNTTACTTAACCCATA
```

带下划线的序列为原 RAPD 引物序列。该序列输入 NCBI (National Center Biotechnology Information) 核酸数据库应用 BLASTn 和 FASTA 检索未见同源序列。已将该序列提交至 GenBank GSSs (Genome Survey Sequences) 数据库, GenBank 接收号为: AZ527393 (用 M13 正向引物测序结果) 和 AZ527394 (用 M13 反向引物测序结果)。

研究中来自雄性基因组特异的 RAPD 标记回收后再扩增(图 2(a)) 并克隆制成探针。图 2(b) 显示该探针经同位素标记后, 与雌雄 DNA 池及随

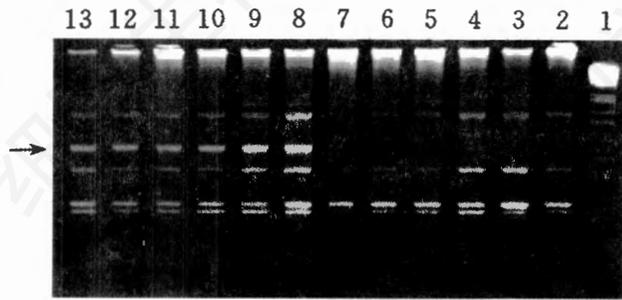


图1 S2[#]引物在雌雄银杏 DNA 池及个体间扩增产物电泳图

1:λDNA Hin III/EcoRI 标准分子量 2:雌性 DNA 池
3-7:雌性个体 DNA 8:雄性 DNA 池 9-13:雄性个体 DNA

1:λDNA Hin III/EcoRI marker 2:DNA pools from female 3 to 7:DNA from five female individuals 8:DNA pools from male 9 to 13:DNA from five male individuals

机的雌雄各两株个体的基因组 DNA 经 *Hae* III 酶切后进行 Southern 杂交,经 15 天放射自显影的结果。

杂交结果显示在雌雄基因组中均有杂交信号,说明该 1000bp 左右来自雄性特有的 RAPD 片段并非全部为雄性基因组所特有,但可以肯定,由于雌性基因组的某一区域缺少该引物序列,所以 RAPD 扩增时该片段在雌性样本中空缺;并且,杂交信号大部分为涂片状,意味着该探针所包含的 DNA 序列在银杏基因组中并非单拷贝序列,而是中度或高度重复序列^[8],或者说该序列至少有一部分是与基因组中的中度或高度重复序列具有同源性^[16]。

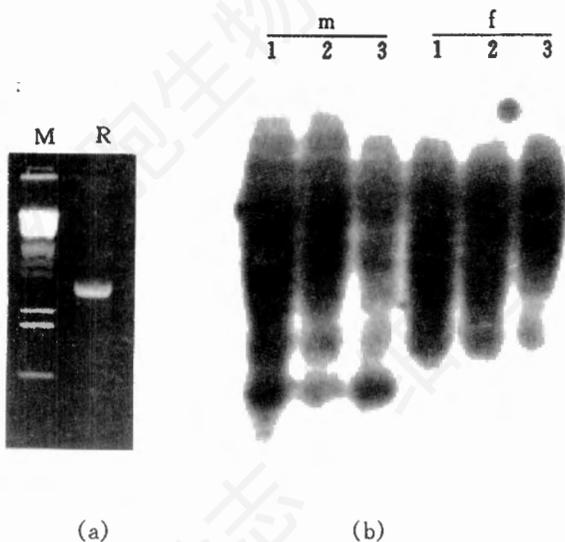


图2 回收的差异带的再扩增(a)及 Southern 杂交(b)结果
M:1:λDNA Hin III/EcoRI 标准分子量, R:差异带回收再扩增结果
m:雄性 DNA(male DNA), f:雌性 DNA(female DNA); 1: DNA 池(DNA pools), 2, 3 随机个体 DNA(DNA of random individuals)

尽管如此, Southern 杂交结果显示:在 *Hae* III 酶切的雌雄基因组 DNA 间显示了限制性片段长度多态性,其中一个 480bp 左右的杂交带纹仅出现在雄性 DNA 池及个体内(图 2(b)箭头所示)。因此我们认为:首先,本研究得到的雄性特异 RAPD 标记可以作为候选有价值的性别鉴定探针,但它能否用于银杏性别的早期鉴定,还需进一步研究;其次,该标记的获得也为今后从细胞或分子水平研究银杏性别问题奠定了基础。

摘 要

本研究应用 RAPD 技术,应用 300 个 10bp 随机单引物及 200 对随机双引物组合,检测了雌雄异株银杏基因组 DNA 的多态性。结果表明:雌雄基因组间具有极高的相似性,在检测到的 3450 个标记中,仅获得 1 个与银杏雄性基因组相关的 RAPD 标记。以该标记为探针,与雌雄银杏基因组 DNA 的 Southern 杂交分析,其杂交信号在两性之间表现为限制性片段长度多态性,该结果为寻找银杏早期性别鉴定的探针以及在细胞和分子水平进一步研究其性别问题奠定了基础。

关键词:银杏 性别相关标记 RAPD

参 考 文 献

- [1] Yampolski C, Yampolski H. 1992, *Bibl Genet.* 3:1-62.
- [2] Parker J S. 1990, *Chromosomes Today*, 10:187-198.
- [3] Lee C L(李正理). 1954, *Amer J of Bot*, 41:545-549.
- [4] Pollock E G. 1957, *J Here*, 48(6):290-294.
- [5] 中尾义则. 1994, *园艺学会杂志*, 65(果树):186-187.
- [6] Chen Ruiyang, et al., 1993, *Cathaya*, 5:41-48.
- [7] 何梅、李懋学, 1996, *遗传*, 18(3):3-5.
- [8] Andreas P, et al., 1997, *Genome*, 40:357-361.
- [9] Y. Hi. Zhang, et al., 1998, *Genome*, 41:141-147.
- [10] Kao F T, Yu T W. 1991, *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*. 88:1844-1848.
- [11] [美] 萨姆布鲁克等著, 金冬雁等译, 1992, 《分子克隆·实验指南》第二版. 科学出版社, 北京.
- [12] Miklas P N, et al., 1993, *Theor Appl Genet*, 85:745-749.
- [13] Erlich HA, et al., 1991, *Science*, 252:1643-1651.
- [14] 兰 宏等, 1996, *中国科学(C)*, 26(3):244-249.
- [15] 愈 慧、赵德标, 1997, *细胞生物学杂志*, 19(3):103-111.
- [16] Donnison I S, et al., 1996, *Genetics*, 144:1893-1901.

ANALYSIS OF GENOMIC DNA BETWEEN MALE AND FEMALE IN A DIOECIOUS PLANT, *GINKGO BILOBA*

WANG Xiao Mei SONG Wen Qin LI Xiu Lan CHEN Rui Yang
(Department of Biology Nankai University Tianjin 300071)

ABSTRACT

In this paper, the genomic DNA polymorphisms of male and female in *Ginkgo Biloba* were detected by using RAPD technique with 300 primers and 200 primer combinations. The result indicated that the genomic DNAs of male and female have a high similarity. Only one out of 3450 RAPD markers was related to the male genome. Southern hybridization analysis with this RAPD marker showed that the hybridization signal is polymorphic between male and female, and this marker maybe useful in screening the sex specific probe of *Ginkgo Biloba*.

Key words: *Ginkgo Biloba* L Sex-related marker RAPD

转化生长因子 β_1 在肾小管上皮细胞的信号介导分子

马春艳 王海燕

(北京大学第一医院肾内科 北京大学肾脏病研究所 北京 100034)

在肾小球疾病慢性化进程中,肾小管间质病变可能是较肾小球病变本身更为重要的因素,小管间质病变的程度与肾功能的进行性丧失密切相关。转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF β) 是一种多功能的细胞因子。在肾纤维化疾病中, TGF β 的作用有利亦有弊,一方面它通过抑制细胞增殖而维持正常的细胞数量,另一方面它通过促进细胞外基质(extracellular matrix, ECM)形成而加重纤维化。在重度系膜增生性肾小球肾炎病人,肾小管 TGF β_1 表达增加较肾小球的更为显著^[1]; 给予治疗后,伴随着肾硬化的减轻,肾小管 TGF β_1 表达显著下降^[2]。在培养的人肾小管上皮细胞, TGF β 不仅促进 FN 等 ECM 合成增加,而且通过上调 ECM 降解酶抑制剂 TIMP-1 的表达而抑制 ECM 的降解。TGF β 通过与其受体结合发挥生物学效应,但受体后信号转导途径迄今所知甚少,目前研究得比较热门的是 SMADs 信号蛋白和促有丝分裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号转导途径^[3]。本研究应用人近曲肾小管上皮细胞系(HK-2), 观察介导 TGF β 抑制增殖与促进 ECM 沉积二种生物学效应的信号转导途径,以期进一步了解 TGF β 在肾小管间质病变中的作用机制。

材料和方法

一、细胞培养

人肾小管上皮细胞系(HK-2)培养于含 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI1640 培养液中,实验前以含 1% 胎牛血清的

培养液培养 24 小时,使细胞基本趋于同步化。

二、材料

HK-2 细胞由美国华盛顿大学 Zager 教授惠赠, TGF- β_1 购自 R&D 公司, FN 抗原和抗体均购自北京医科大学细胞生物学教研室, 抗 TGF β_1 受体 RI、RII、Smad2 及 Smad6 等抗体为 Santa Cruz 公司产品, 逆转录试剂盒购自 Promega 公司, 预染蛋白 marker 购自 Bio Rad 公司; ³H-脯氨酸、100bp DNA ladder 及 MBP 均购自 Sigma 公司。

三、细胞增殖的测定

细胞以 $10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$ 的密度接种于 96 孔细胞培养板, 采用 ³H-TdR 掺入法测定细胞增殖。

四、培养液内纤连蛋白(fibronectin, FN)含量测定

收集细胞上清液, 4℃, 2000g 离心 10 分钟, 去除细胞沉渣, 取上清液, 以间接竞争抑制 ELISA 法测定 FN 含量。

五、细胞总胶原合成和分泌的测定^[4]

制备 $10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$ 细胞悬液, 接种于 24 孔板, 当细胞长至融合状态时, 以含 1% 胎牛血清的培养液培养 24 小时, 然后加入 TGF β_1 , 作用 24 小时后, 测定细胞内 ³H-脯氨酸掺入量及培养液内 ³H-羟脯氨酸的放射活性以判断细胞总胶原的合成和分泌情况。

六、TGF β_1 、RI、RII、Smad2 及 Smad6 蛋白的测定

以 Western blot 法检测。细胞裂解后, 收集于 Eppendorf 管中, 4℃, 12000g 离心 10 分钟, 取上清。测定蛋白浓度后, 取 50 μg (检测 TGF β_1 、RI、RII) 或 100 μg (检测 Smad2、Smad6) 样品, 于 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分子量在 14Kd-220Kd 的预染蛋白 marker 作为分子量标准, TGF β_1 、RI、RII 蛋白条带相应的分子量为 53Kd 和 70Kd; Smad2 和 Smad6 蛋白条

本文 2000 年 7 月 10 日收到, 12 月 19 日接受。
本课题受教育部博士点专项基金资助。